

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

PCT/PTO 2



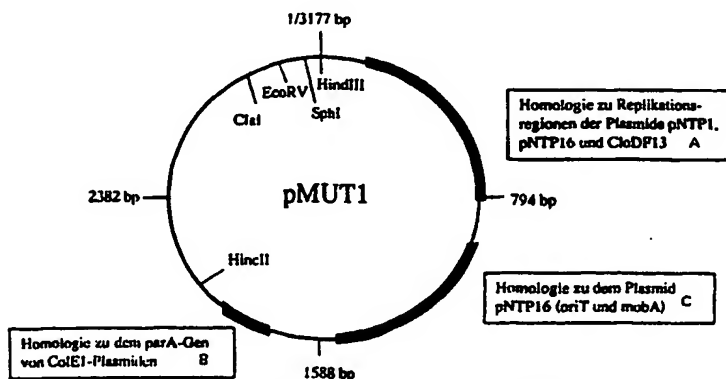
N 2005

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/70, C12Q 1/68, A61K 31/70</b>	<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/44134</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Oktober 1998 (08.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP98/01720</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: 1. April 1998 (01.04.98)		
(30) Prioritätsdaten: 197 13 543.9 2. April 1997 (02.04.97) DE		
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PHARMA-ZENTRALE GMBH [DE/DE]; Loerfeld- strasse 20, D-58313 Herdecke (DE).		
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HACKER, Jörg [DE/DE]; Edith-Stein-Strasse 6, D-97218 Gerbrunn (DE). SONNEN- BORN, Ulrich [DE/DE]; Eichenweg 6, D-44799 Bochum (DE). SCHULZE, Jürgen [DE/DE]; Alice-Bloch-Strasse 7, D-14558 Bergholz-Rehbrücke (DE). BLUM-OEHLER, Gabrielle [DE/DE]; Goethestrasse 3, D-97072 Würzburg (DE). MALINKA, Jürgen [DE/DE]; Paulswiese 11, D-59379 Selm (DE). PROPPERT, Hans [DE/DE]; Rosen- strasse 102, D-58095 Hagen (DE).		
(74) Anwalt: HARMSSEN & UTESCHER; Adenauerallee 28, D-20097 Hamburg (DE).		Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: BACTERIAL PLASMIDS

(54) Bezeichnung: BAKTERIELLE PLASMIDE



Restriktionskarte des Plasmides pMUT1. Schwarze Balken symbolisieren die vorgefundenen DNA-Sequenzhomologien zu den DNA-Sequenzen von Plasmiden anderer Enterobakterien. Die Positionen der relevanten Restriktionschnittstellen sind angegeben.

RESTRICTION CARD OF THE pMUT1 PLASMID. BLACK BARS SYMBOLIZE THE DNA SEQUENCE HOMOLOGIES FOUND WITH THE DNA SEQUENCES OF PLASMIDS OF OTHER ENTERIC BACTERIA. THE POSITION OF THE RELEVANT RESTRICTION INTERSECTIONS ARE INDICATED.

A... HOMOLOGY WITH THE REPLICATION AREAS OF pNTP1, pNTP18 AND CloDF13 PLASMIDS  
B... HOMOLOGY WITH PAR A GENE FROM ColE1 PLASMIDS  
C... HOMOLOGY WITH THE pNT18 (oriT AND mobA)

(57) Abstract

The invention relates to plasmids and DNA sequences having the nucleotide sequences illustrated in figure (1) or (4) and to the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Plasmide bzw. DNA-Sequenzen mit den in den Abbildungen (1) oder (4) dargestellten Nucleotidfolgen und deren Verwendung.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Bakterielle Plasmide

Die Erfindung betrifft bakterielle Plasmide.

- 5 Plasmide sind kleine, extrachromosomale, meist zirkuläre und selbständig replizierende DNA-Moleküle, die in fast allen Bakterien und auch in einigen Eukaryonten sowie in den Mitochondrien vorkommen. Die Größe der Plasmide variiert zwischen etwa 1,5 bis 300 kb.
- 10 Bakterielle Plasmide sind in der Regel zirkulär, kovalent geschlossen und supercoiled. Häufig tragen sie Resistenzgene gegen Antibiotika oder Schwermetalle, Gene für die Metabolisierung untypischer Substrate oder Gene für eine Reihe von artspezifischen Charakteristika, wie metabolische Eigenschaften oder Virulenzfaktoren. Manche Plasmide können von einer
- 15 Zelle in eine andere Zelle übertragen werden. Da die Pathogenität von Bakterien nach heutiger Ansicht zum Teil auch durch die Eigenschaften der Plasmide bedingt ist, besteht zunehmend ein größeres Interesse an der Aufklärung der Eigenschaften der Plasmid-DNA.
- 20 Von der Familie der Enterobacteriaceae, zu der 14 Hauptgattungen und 6 weitere Gattungen gehören, ist bekannt, daß diese unterschiedliche Eigenschaften ausbilden können. Typische Beispiele sind Escherichia, Salmonella und Klebsiella. Escherichia coli (E. coli) ist das klassische Objekt der Bakteriengenetik. Erst die Entdeckung und Charakterisierung verschiedener Viru-
- 25 lenzfaktoren von E. coli ermöglichte es, allgemein zufriedenstellende Erklärungen dafür zu finden, daß Stämme dieser Art eine zum Teil extrem unterschiedliche Human- bzw. Tierpathogenität aufweisen, die von Aviru-

- lenz bis hochgradiger Virulenz, wie im Falle der sich neuerdings ausbreitenden als „EHEC“ benannten Variante, reicht. So sind sowohl für extraintestinale als auch für intestinale E.-coli-Stämme bereits eine Reihe von Virulenzfaktoren beschrieben worden, die zum Teil gut charakterisiert sind.
- 5 Für pathogene E.-coli-Stämme der Sero-Gruppe O6:K5 wurden Virulenzfaktoren wie z.B. Haemolysine und P-Fimbrienadhäsine gefunden, die nachweislich bei apathogenen Vertretern dieser Sero-Gruppe nicht auftreten.
- 10 Virulenzgene werden bei Enterobakterien in der Regel auf großen Plasmiden (ca. 60 kb) gefunden. Es gibt aber auch Enterobakterien mit kleinen, sogenannten kryptischen Plasmiden, deren Funktion bisher noch nicht sicher bestimmt werden konnte.
- 15 Da bekannt ist, daß im Falle von E. coli Virulenzfaktoren zumindest teilweise auch in den Genen der Plasmide vorhanden sind, besteht daher ein Bedarf nach weiteren Untersuchungen zur Auffindung und Charakterisierung von Plasmiden bei Enterobakterien und insbesondere Escherichia, um z.B. die Diagnose- und Therapiemöglichkeiten bei Erkrankungen nach Infektionen
- 20 mit Enterobakterien zu verbessern. Die Plasmide bzw. ihre bakteriellen Träger oder entsprechende synthetisierte DNA können in der mikrobiologischen Analytik oder Diagnostik, medizinisch in der Therapie oder Prophylaxe und auch zu ernährungsphysiologischen oder probiotischen Zwecken Verwendung finden. Darüber hinaus sind Plasmide, und zwar
- 25 insbesondere solche von E. coli, bekannte Expressionsvektoren in der Gentechnologie, so daß auch aus diesem Grunde ein Interesse an einer verbesserten Kenntnis der Eigenschaften derartiger Plasmide besteht.

Dazu wurden molekulargenetische Untersuchungen mit dem E.-coli-Stamm DSM 6601 durchgeführt. Die von diesem Stamm erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe von Datenbankprogrammen einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen und mit bereits vorliegenden DNA-Sequenzen anderer Bakterien verglichen.

Der Stamm DSM 6601 besitzt zwei kleine Plasmide mit einer Größe von 3177 bzw. 5552 bp, die als pMUT1 bzw. pMUT2 bezeichnet wurden.

10

Die DNA des kleineren Plasmids pMUT1 wurde nach Restriktionsspaltung mit dem Enzym *Hind*III als lineares Fragment in den Vektor pUC18 subkloniert, anschließend wurde die DNA-Sequenz ermittelt. Diese ist aus der beigefügten Abbildung 1 ersichtlich. Die so erhaltene DNA-Sequenz wurde einem Homologievergleich mit der GenEMBL-Datenbank unterzogen; die Ergebnisse dieser Gegenüberstellung ergeben sich aus Abbildung 2.

Für diesen Vergleich wurde die *Hind*III-Schnittstelle als Position 1 festgelegt. Von der Position 200 bis 800 bp zeigt die DNA des Plasmides pMUT1 signifikante Homologien zu verschiedenen Reduplikationsstartstellen (origins of replication) anderer enterobakterieller Plasmide, speziell zu den Plasmiden NTP1, NTP16 und CloDF13. Im Bereich von Position 950 bp beginnt eine 570 bp große Homologie zu dem Plasmid NTP16, das ursprünglich aus *Salmonella typhimurium* isoliert wurde. Diese Homologie umfaßt das *mobA*-Gen, welches für die Mobilisierbarkeit des Plasmides NTP16 notwendig ist sowie einen origin of transfer (*oriT*). Darüber hinaus wurden von Position 1790 bis 1920 bp signifikante Homologien zu den Genen *parA* und *cer*

25

gefunden, die für die Stabilität und die kontinuierliche Weitergabe und Verteilung von Plasmidmolekülen bei der Zellteilung von Bedeutung sind. Für die übrigen DNA-Regionen konnte keine signifikante Homologie identifiziert werden.

5

Darüber hinaus wurde die DNA-Sequenz des Plasmides pMUT1 in eine Aminosäure-Sequenz umgeschrieben und auf das Vorhandensein von offenen Leserastern analysiert. Es wurden 6 verschiedene Leserastermöglichkeiten untersucht. Es konnten insgesamt 5 offene Leseraster mit einer Größe von  
10 143, 62, 56, 49 und 48 Aminosäuren gefunden werden. Eine grafische Darstellung der Analyse ist in Abbildung 3 gegeben.

Die DNA des größeren Plasmides pMUT2 wurde nach Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *SphI* ebenfalls in den Vektor pUC18 subkloniert und  
15 anschließend vollständig sequenziert. Die DNA-Sequenz ergibt sich aus Abbildung 4. Die so erhaltene DNA-Sequenz wurde mit Hilfe des GenEMBL-Datenbankprogrammes auf Homologien zu bereits bekannten DNA-Sequenzen untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 grafisch dargestellt. Die  
20 DNA des Plasmides pMUT2 zeigt signifikante Homologien zur replicon region verschiedener ColE1-Plasmide von *E. coli* in der Position 890 bis 1660 bp. Eine weitere signifikante Homologie zu ColE1-Plasmiden befindet sich in der Region von Position 3800 bis 4950 bp. Hierbei handelt es sich um Homologien zur Mobilisationsregion von ColE1-Plasmiden. Im Bereich  
25 von Position 3770 bis 4980 bp wurden Homologien zu einem Plasmid des *Pasteurella-haemolytica*-Stammes A1 gefunden. Auf diesem Plasmid befinden sich Gene, die bei *Pasteurella* für antimikrobielle Resistenzproteine kodieren. Die Homologie erstreckt sich jedoch über den intergenischen Bereich, so

daß es sich möglicherweise auch um Sequenzen handelt, die für die Mobilisierbarkeit des Plasmides nötig sind.

Es wurden zwei Regionen identifiziert, die signifikante Homologien zu anderen enterobakteriellen Plasmiden aufweisen. Dabei handelt es sich um die origin-of-replication-Regionen und die mob-Regionen, die für die Mobilisierbarkeit der Plasmide notwendig sind. Für pMUT 2 konnte für die übrigen DNA-Abschnitte keine signifikante Homologie identifiziert werden.

10 Auch die DNA-Sequenz des Plasmides pMUT2 wurde anschließend in eine Aminosäure-Sequenz umgeschrieben und auf das Vorhandensein von offenen Leserastern analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3 ebenfalls grafisch dargestellt. Es wurden 5 offene Leseraster mit Aminosäure-Sequenzen in der Größenordnung von 327, 318, 264, 76 und 63 Aminosäuren gefunden.

15

Neben den bisher unbekannten Plasmiden pMUT 1 und pMUT 2 ist auch deren Kombination bisher in keinen E.-coli-Stämmen oder anderen Enterobakterien gefunden worden.

20 Das Vorkommen der Plasmide steht möglicherweise in Beziehung zu den metabolischen und medizinischen und/oder ernährungsphysiologisch bzw. probiotisch nutzbaren Eigenschaften des Stammes DSM 6601.

Die Untersuchung der Plasmide ermöglicht eine genauere Bestimmung und Analyse von Enterobakterien und insbesondere der Escherichia-Gruppe. Darüber hinaus bieten sich diese Plasmide als unbedenkliche Expressionsvektoren für die Gentechnologie an.

Im folgenden wird die Erfindung anhand der Beispiele näher erläutert:

5    Beispiel 1:  
     Plasmid-Isolierung

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte in Anlehnung an das Verfahren  
Birnboim et al. (Birnboim, A.C. und Doly, J. (1979) Nucl. Acids Res. 7:1513-  
10    1523 A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plas-  
mid DNA).

3 ml LB-Medium werden mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht  
bei 37° C geschüttelt. Diese Kultur wird in einem Eppendorfgesäß abzentri-  
15    fugiert, der Medienrückstand wird mit einer Pipette entfernt. Das Zellsedi-  
ment wird mit 100 µl Lösung I (50 mM Glukose; 10 mM EDTA, pH 8; 25  
mM Tris-HCl, pH 8) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtempe-  
ratur gibt man 200 µl Lösung II (0,2 N NaOH; 1 % SDS) dazu, mischt bis  
zum Aufklaren und läßt das Eppendorfgesäß weitere 5 min auf Eis stehen.  
20    Dann fügt man 150 µl Lösung III (3 M Na-Acetat, pH 4,8) hinzu, schüttelt  
kurz bis die chromosomale DNA flockig ausfällt und beläßt den Ansatz  
nochmals 5 min auf Eis. Die ausgefällte chromosomale DNA und die  
Zellreste werden 5 min in der Zentrifuge pelletiert und der Überstand mit der  
Plasmid-DNA wird in ein neues Gefäß überführt. Zur Reinigung der Plasmid-  
25    DNA werden 50 µl Phenol und 150 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)  
zugegeben und nach kurzem Schütteln 2 min abzentrifugiert. Die wäßrige  
Phase wird in ein neues Gefäß pipettiert. Die Plasmid-DNA wird mit 2



-7-

Volumina eiskaltem Ethanol ausgefällt und 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 % Ethanol gewaschen und in der Speedvac getrocknet. Die Plasmid-DNA wird in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

5

Beispiel 2:  
DNA-Sequenzierung

- 10 Die DNA-Sequenzierung erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von F. Sanger et al. (Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 DNA sequencing with chain terminating inhibitors)
- 15 Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem T7-Sequenzier-Kit der Firma Pharmacia LKB.

Für den Denaturierungsschritt werden 8  $\mu$ l (1,5 bis 2  $\mu$ g) Plasmid-DNA mit 2  $\mu$ l 2 N NaOH gemischt, kurz abzentrifugiert und 10 min bei  
20 Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wird mit 3  $\mu$ l 3 M Na-Acetat, pH 4,8 sowie 7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 60  $\mu$ l eiskaltem Ethanol<sub>absolut</sub> 15 min bei -70° C gefällt. Die gefällte DNA wird 10 min abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet.

- 25 Für die Annealing-Reaktion wird die denaturierte DNA in 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> suspendiert und mit 2  $\mu$ l Annealing-Puffer und 2  $\mu$ l Primer (40 ng) gemischt. Der Ansatz wird 20 min bei 37° C inkubiert, so daß eine Bin-

ERSATZBLATT (REGEL 26)

5      dung des Primers an die Template-DNA erfolgen kann. Der Reaktionsansatz wird 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt und dann entweder sofort für die Labelling-Reaktion verwendet oder bei -20° C eingefroren. Für die Labelling-Reaktion werden 3 µl Labelling-Mix, 1 µl [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]dATP  
10      und 2 µl T7-Polymerase (die T7-Polymerase wurde 1:5 mit Enzymverdünnungspuffer verdünnt) in den Annealing-Reaktionsansatz einpipettiert und nach kurzem Mischen 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen werden die für die Terminationsreaktion bereits vorbereiteten Sequenziermische (je 1 Gefäß mit 2,5 µl 'G', 'A', 'T' und 'C'-Mix „short“) bei 37° C vorgewärmt. Nach Ablauf der Labelling-Reaktion werden jeweils 4 µl davon zu den vier Sequenziermischen zugegeben und kurz mit der Pipette gemischt. Die Terminationsreaktionen werden 5 min bei 37° C inkubiert. Zum Beenden der Terminationsreaktionen werden je 5 µl Stop-Lösung zugegeben. Die Ansätze werden nun in einen Inkubator mit 95° C überführt, 2 min denaturiert und dann auf Eis gestellt. Je  
15      2,5 µl der Reaktionen werden auf ein Sequenziergel [25,2 g Harnstoff, 22 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidestr</sub>, 6 ml 10x TBE, 10 ml Polyacrylamid (40 %), 2 ml Ammoniumpersulfat (16 mg/ml), 60 µl TEMED] in der Reihenfolge 'G', 'A', 'T', 'C' aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 40 Watt und  
20      1500 Volt für 4,5 h.

**Patentansprüche**

1. Plasmid mit einer in Abb. 1 dargestellten DNA-Sequenz und deren Allelvariationen.  
5
2. Plasmid mit einer in Abb. 4 dargestellten DNA-Sequenz und deren Allelvariationen.
3. DNA-Sequenzen mit oder aus den in Abb. 1 dargestellten  
10 Nucleotidfolgen.
4. DNA-Sequenzen mit oder aus den in Abb. 4 dargestellten Nucleotidfolgen.
- 15 5. Verwendung der Plasmide oder DNA-Sequenzen nach Anspruch 1 bis 4 in der mikrobiologischen Analytik und/oder Diagnostik.
6. Verwendung der Plasmide oder DNA Sequenzen nach Anspruch 1 bis 4 zu medizinischen und/oder ernährungsphysiologischen bzw.  
20 probiotischen Zwecken.
7. Verwendung der Plasmide oder DNA-Sequenzen nach Anspruch 1 bis 4 als Expressionsvektoren.

## Abbildung 1

HindIII  
AGCTTTTAGAGCTTGGATACCATGACCCAATGAAGCTACCTCAAACTTTGAATGATCGA  
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60

GCGGCAGGCTAAATGAAATCTTGAGATTCAATCAGTCTCGTCGTAATCTCACTATTGTAA  
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120

AAACGAAAAAACCACCCTGGCAGGTGGTTTTTCGAAGGTTAGTTAATCCTGGCAGATTCT  
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180

CTAACCGTGGTAACAGTCTTGTGCGAGACATGTCACCAAATACTGTCCTTTCAGTGTAGC  
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240

CTCAGTTAGGCCGCCACTTCAAGAACTCTCGTTACATCTCTCGCACATCCTGCTTACCAG  
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300

TGGCCGTTGCCAGTGGCGTTAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTAC  
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360

CGGATAAGGCGCCAGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCG  
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420

AACGACCTACACCGAACCTGAGATACCTAACAGCGTGACGTATGAGAAAGCGCCACGCTT  
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480

CCCGAAGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAC  
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540

GAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCAC  
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600

CTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAAG  
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660

CCTCCCGCGGAGACCCCTTCTTCTGGGATCTTTGTCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCGGT  
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720

TTTATCCCCGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGACACCGCTCG  
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780

CCGCAGTCGAACGACCGAGCGTAGCGAGTGAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGAGAATTTA  
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840

TGTGACATTTTTCTCCTTACGCTCCTCTATGCCGTTCTGCATCCTGTCCGGATGCGTTATA  
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900

TCCCGGTAAGATTTTCCGCTTCAAAGCGTGTCTGTATGCTGTTCTGGAGTTCTTCTGCGA  
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960

GTTTCGTGCAGTTTCTCACACATGGCGGCCTGTTTCGTTCGGCATTGAGTGCGTCCAGTTTTT  
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020

CGAGCAGCGTCAGGCTCTGACTTTTTATGAATCCCGCCATGTTGAGTACGGCTTGCTGCT  
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080

GCTTATTCATCTTTTTCGTTTTCTCCGTTCTGTCTGTCTCATCTGCGTTGTGTGATTATATCG  
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140

ERSATZBLATT (REGEL 26)

CGTACCACTTTTCGACTGTTTTGCTGCCGCTATTCTGCCGCTTGGCTTTTTGACGGGCAT  
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200

TTCTGTGACACAACACTGTCACTGCCAAAAAACTGCCGTGCCTTTGTGCGTAATTTCGAGC  
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260

TTGCTGACAGGACAGGATGTGCAATTGTTATACCGCGCATACATGCACGCTATTACAATT  
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320

GCCCTGGTCAGGCTTTGCCCGACACCCATGTCAGATACGGAGCCATGTTTTATGACAAA  
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380

ACGAAGTGGAAGTAATACGCGCAGGCGGGCTATCAGTCGCCCTGTTCTGCTGACGGCAGA  
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440

AGAAGACCAGGAAATCAGAAAAAGGGCTGCTGAATGCGGCAAGACCGTTTCCGGTTTTTT  
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500

TCGGGCGGCAGCTCTCGGTAAGAAAGTTAACTCACTGACTGATGATCGGGTACTGAAAGA  
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560

AGTTATGAGACTGGGGGCGTTACAGAAAAAACTCTTTATCGACGGCAAGCGTGTCGGGGA  
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620

CAGGGAGTATGCGGAGGTGCTGATCGCTATTACGGAGTATCACCGTGCCCTGTTATCCAG  
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680

GCTTATGGCAGATTAGCTTCCCGGAGAGAAAACTGTGAAAACTGACGGTATGAACACCG  
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740

TAAGCTCCCAAAGTGATCACCATTTCGCTTTCATGCATAGCTATGCAGCGAGCTGAAACGA  
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800

TCCTGACGCATCCTTCCTGTTTTTCCGGGGTAAAACATCTCTTTTTGCGGTGTCTCGCGT  
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860

CAGAATCGCGTTTCAGCGCGTTTCAGTGGTGCGTACAATTAAGGGATTATGGTAAATATAT  
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920

GAGCTATGCGATAACTTTAACTGTGAAGCGATGAACCCATTACAGGCAAGCCCAATTACT  
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980

CCTGACAGTGGTTTAGCCAGAAGCAGGGCTACCAAGACCAATGCAATAAGTAATATATCG  
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040

TTTTGCTATCGTGCCATCCGTGCGGCTCAGTTCATTGTGCTTTTTTAAGCTGTGCTTTT  
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100

TCTTACGGTATATACCGGTTTTTTATGGCGTGGTTTCTTAACTTGTTTCAGCTACTGATGG  
2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160

ACCCATGTATCTAGGTAGTCAACTAGCTTTGTTAGATCATAAAATATTGCGACCACCATA  
2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220

TCGGCGATCACTCTTCGATGTTGGTTTCTTGTCCAAGAGATTAGCTTTTTCAAGATCATT  
2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280

GATAGCTCTCTGAACAGTCCGTACAGAAACCCCATACGTATGGCTAGACTTTCCATTGA  
2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340

ERSATZBLATT (REGEL 26)

```
CGGATGCGGCCACTCTTGCAAACCTCCACCAGTGAACGATCAGGTTAAGTAGTGTGTTAAA
2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400

GGCCACTGAAGTTAGCTTTTTCTCGTTTTGTATAAAAAACAATACGGTAGGCACTGCTGT
2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460

CCAGCCAAGAGACAAACCGCCAGCTTTCATTTATTCTTAACGGAGTAAGTCATTGATTT
2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520

TCCTAAGCCCCAAAATATTTAAAGTATATATTATATGTATATTCATATGAATAGGGTGAC
2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580

ACTGGCGCCATTATTGTGCAACCAAAAAAGACTACTCTGAAAACGAGGAAAAGATTTTTT
2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640

CCTGCCTGAATTAGATACGGAGTTAGCGATATGAAAACCGAACAACGTCATGATCTTGTT
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700

AAAGATATTGAGGTTTTTGGCGTATCCTTGTCTCTGTTGATTTCCAGAGCGAATGAGAAG
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760

TCTGTTACAATGCCATCTGGTCTAAGTCGGGAGCAGAGAAGAGCATGGGCAGCGGAGCAG
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820

GCGCGCAAAATCCACAATTGAATATTGTCTCATTCTCTGAGACCTTCAACCTTTATTACA
2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880

CATCCAGATATTCTGCAAAAACACTCGATAAAATCGATGATTTTCATTGAGCATTTTGAAA
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940

AATACAATCTCTTTGGCGATCCTTTAAAAGGATATCCAGCTTGGACTGGCAAAGTATCGC
2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000

CATCGTGGAAGTGCCTGATCATTACGAAAACAAAGAAGCTATTGAGAAGTATGCTAGAG
3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060

CTAACAAATTATGGCATGCTCATTTAGGCGATCCGGTTTTTTAAAGATACGTTTCATGGGA
3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120

AATACAAGGTTTCTGACTGGGTTATTCATTTCAGCGGCTGACACCGAACCATATAA
3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3177
```

**Abb. 1:** Darstellung der Nukleotidsequenz des etwa 3 kb großen Plasmides pMUT1 des Stammes DSM 6601.

Abbildung 2

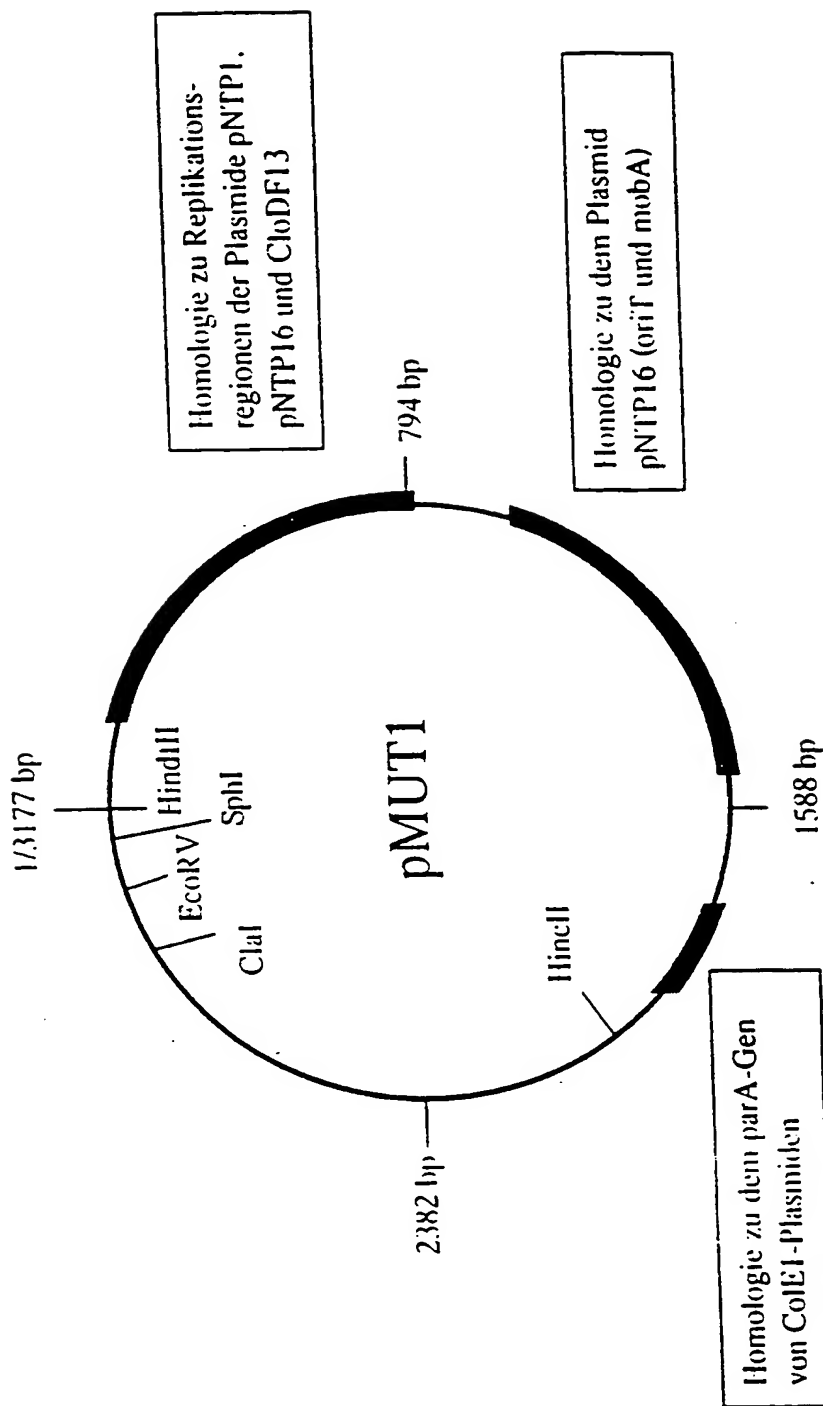


Abb. 2: Restriktionskarte des Plasmides pMUT1. Schwarze Balken symbolisieren die vorgefundenen DNA-Sequenzhomologien zu den DNA-Sequenzen von Plasmiden anderer Enterobakterien. Die Positionen der relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

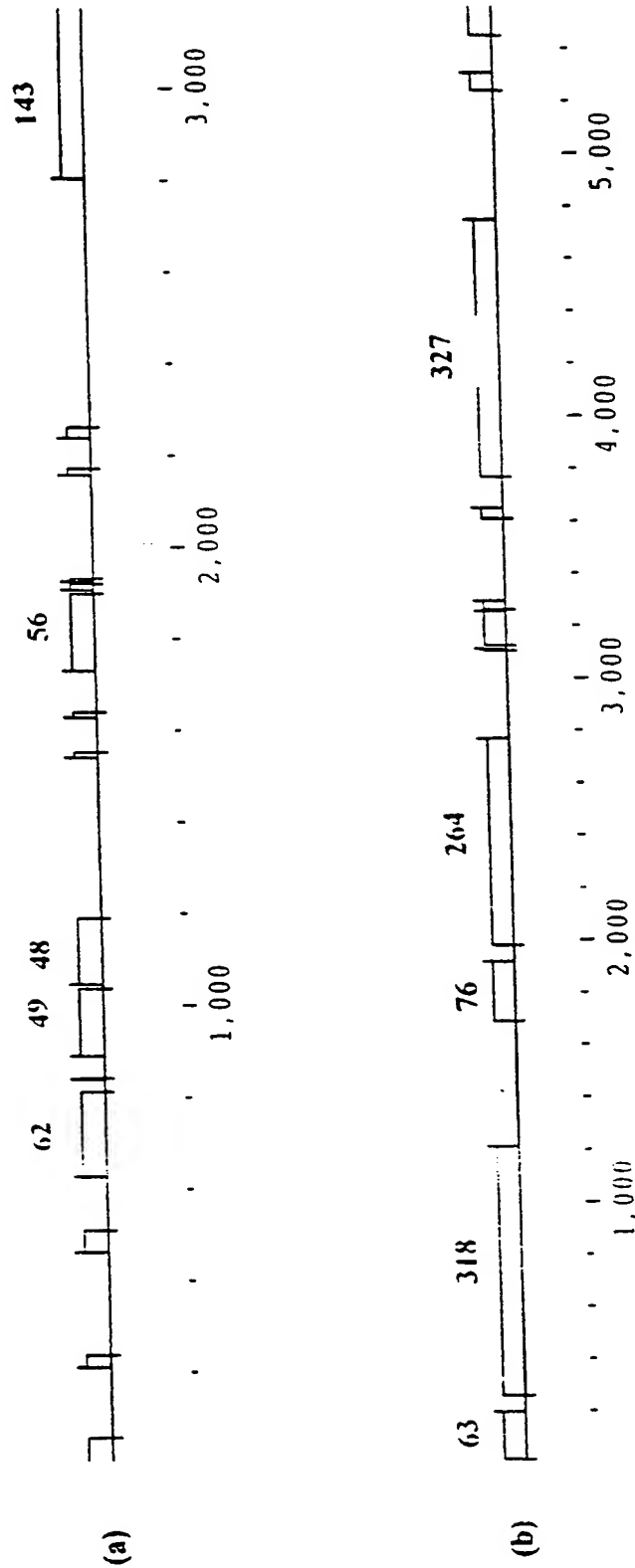


Abb. 3: Darstellung der für die beiden Plasmide pMUT1 (a) und pMUT2 (b) vorgefundenen offenen Leseraster. Die Größe der offenen Leseraster ist angegeben.



## Abbildung 4

*SphI*

ATCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCTCAAGGCCTGACAACCCTGTCGTTTTTCGCCAA  
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60

CTCCTGCGAGGTAACCTCGAACATGCGCTGTAAGTTGGCGTAGCTGTCTCTGCCACGCTT  
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120

GCTGCTGTTGTTCGTAGTGCCTCTGTAAGCTCTCTAATGCGCTCAGAAGCTGCTGCTCCA  
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180

TTTCGGTCATGAATCTCTTCACCCTGATAGATAAAACCGCCCAGAATCGATTCTGTGGCG  
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240

TCTGATGAGGTTATTTGGCGCTGTACTTGATGACCTGACGATGTTGAGCGTTCTTGTACT  
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300

CGTCGATCTTCTTCGCCCCCTGCGGAAGGATCAGGTAATACACGCTCTTGTTCTTGGAAT  
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360

CGTGAATTATCGATACGCCGGCTCCGGTCTGGCTCTTTAAGTCCTGCAGGATCTGGCTCT  
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420

GCTCGCTGATTTCTGTTCTGGCGTTCGACCACGATAGTCCCGAGATACCAAGCTACTCCAA  
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480

TCAATATCGCAAACAGGATCCCACTTAATGCCAGGCTGTACAGCCATGTCATTCCGACTA  
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540

AGCGGTGTATCTGTTTTAGCTGGCTGTCTGTTCTCTTCTTGATAGCGGTCTGTATGTTCC  
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600

CTGAGCTTAATTTCAAGGCCTCGGTGATACGTTTCTCGTGCTTCTCGaAATGCGTTTCGCG  
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660

ACGCTCGTTGCGGTAGTCTTGGCTTGCTG . CTTGATTTGCTCTCGAACTCCCGCGCTAA  
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720

ATTTAAATCTCGCTCATAAGCACTCCTTTTAAGCGAATATTCGGGCCACCTGCCGGAT  
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780

CAGCAATACTGATACTGGATTGTTTCCCGTACGACCGACAATCCGGCATCGGTAAGGT  
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840

GGGAAATCACCCCTTTACGATCCGTAATTTCTCCCTGCTCAATCAAGCTGATTAGCCCTT  
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900

TGGTAATGGCTTCCGCTGCCTGCTGTTTGTGCGAGGAAGGTCATTAGAGGGGGTTAATG  
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960

CTCGGCGATTAGCAGGGTCATTCCGGTTCGCGTAACCCAAGCCGGTCATTGGTGAGGGTTT  
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020

GCCATGCGTTAACACGAGGCCGGTCAGCCCGATCAAAGTAAGGTTGTAGCCGTTTCCCGC  
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080

TCTGCAATTCGATGTTTCGGGATAACAAAATTCAATTCAAGACGCCCTTTGTCCTGATGTT  
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140

GAACCCAGAGGCAGGCATACTGGTCTTTATCTAGACCGGTCATCAATGTCTGCTCCCATT

ERSATZBLATT (REGEL 26)

1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
CATCCATCAATCGCTGCTTTTCGCCTTCGGGTAAATCACTCTCCTGAAAAGAGAGCACGC  
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
CAGAGGTATAAGTTCGGGCAAATTGCGAG. CATCAATCAGCTCTTTGACGTGCTCAGGGT  
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320  
TACCCCGTAACACCGTCGCTTGTTGCGCTGACGATCAGGGCCCAGAAGGTAATCGACAG  
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380  
GACCACTCCCGCCACCGGCACCACGACCATGAATCCTTAACGATCAGGATGTTGCTCCAG  
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440  
CAGtTCGGCAAGATGtTGGTCAATGCTATTGAGCACCGCTAACAACGACACCCGTTCTTG  
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500  
CGGCGGTAAAGCCATGCTGATTCAAGTAACGGGCTATTTGATTGAGGTTATTACCGATCCC  
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560  
GCTGACCTGACGTAACAAGGTCGGGTCTACGGTaAGGtTAGCGGACGACGcCCGAGCTGT  
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620  
ACGCGATTTCGCCTAAGCCAACGGCTCGTAACCACTCGGCCAAATGCTTACGGTCACAGCG  
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680  
TTCAAGTAGCCGCTGATGCTCCGCTTCGGTGAGTCTGATTTTGATCTCTTTGGTGCGCTT  
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740  
TTCCATGAGAATCCGCTGAGAAAGTTTCGCACCCAAAGTGCGAATTTTCGCAGTGGATGC  
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800  
AAGGGGTTTCGGGGGGCGGCGAGCCCCCTGAAACAGTCACAGACGGCACCTCGAAGAgGG  
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860  
GACGCTGTGTACTGrCTTAGTACAGCATCTATCGTACATCGAGGTTCGCATCACGCACA  
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920  
AACAAAAAGCCCCGAAAAGCAGGGCTGTTATCTGATATAGGTTGTTTTGTCTCACACGG  
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980  
CAGCGGAAGAGGAATCCGAAGTGGTACTGGTAGTAGTATTGGATGCTGCTGACGATATTT  
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040  
TCCGCTTTGACCCAAGGCTTAAATAATCAATGCCTGTAATCAACGATCTCAATACGCCTT  
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100  
CGGATACCATAGCGATAAACGTATCTTGCTGGTTATGGCTTGCGATGCAAATCGTAGCAT  
2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160  
CACCTTTTTTATACTTTAAAACACCTGCTAAATATCCATTTTCATCTAGAACACTCTTAA  
2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220  
GATGTTCAATTTGTTATTGTTTGTAGCGTTTGCTTTGTTTCGCTTCGAGCATACGCCTTAG  
2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280  
CTAGCTTCCGAGAAAAAGCATCCGCATCATGACTATCTTTATTTACTCGCTCAATAAATT  
2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340

ERSATZBLATT (REGEL 26)

2341 TGCTTAAGTCAACAAATCCCTTAAAACGAGTGGACATATTGTTAACAAAATCAGTGGCAG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400

2401 CATTTTTTATCCATGCTTTATAGCCAAAAAACGCTCGAAAAACATTTTGGTCGTAGATAA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460

2461 ATACCGTATCGCCAGCAAAAACAAGAGATGCCTTACCATCAATAGAAATCATATCTTGAT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520

2521 CTACTCGAGATAGTTCTTTTTTGCTAAACCCATAAAAAATTATTTTCTTTCTTGATAAGT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580

2581 TTTGAACTGGATATTGCTTCTTGATATATGGTTATACAATTGTCGTCATTATTCTTACTCA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640

2641 AAACGAAAATGATTGAGTCAACTTTTGATATTAGATCCACACTGTCAAAATCAACAATTG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700

2701 GGATATTTTCATTGCCATCACCACCAAAACCCAGCATCAAAACACAATGCCAGTCAGAACT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760

2761 TCATTTGCTCATTATCATACTGCTCAGCATCATTTAAAAATGAAATGGTGTGGTGCGGT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820

2821 CACTTAGTGTATTAACATCTGATACTATCACAACCCGATTTTCTAAATCAGATATAGTTT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880

2881 TCTTTATCACATTATCAATAATGGACTGTTTTAGCTCACTGTCATTTTAAAGGATGGCAA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940

2941 TTTTATAGCTAAAAGAGTCCTTAGCACCCGCTTTACCTTTATTTTTAAAGTTAAAGTAAG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000

3001 TGTGCAATGTAACATCGTTAATATCACAATCAAAATGCTTATACAGTTCTAAAAGCTCTT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060

3061 GTGCTTTTtCTTCATTATGCTCCAAAGCATCAAGATCTtAAGGCATCGTCACTCATCATC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120

3121 ATTCTCTATGATTTTTTtCGCGAACGTTAAATAaTCATCATGATTTATAaCTCTGATAA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180

3181 AATCATTTTCTTTTATTAAATCTTTAGATAAAACTATCAAACCTCACCCTCTTGCGTTTTT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240

3241 tCCCTTCCATTAGCTACCACACTGTAAGTAATCTTATAGGCAGAAACATTAAATAATGAC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300

3301 AATGTTGGGTTGCAGTGAATTCTTTTTGTTTTGATGTGCAAAAAACCGACGATAATCAAA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360

3361 ACAAACAAAAAATTAACATATTTGATGGTTTGCTTAAATCAGTAAAGACCAACGGCATT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420

3421 ATGTACGTTGATAAAAAAGAAAGATACTCACCAGGATTCTTTTTTACATGAAACGACCTTT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480

3481 AACTTTCTTGACACCGCACCAGGAGTCTAAGTTTTTCAAAACCCATCGATACCAATGTAT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540

ERSATZBLATT (REGEL 26)

GTATAAGAACAAGTTAAAATCAAAGCCCcGCAGATCACTGACCTCAATACAGAAAATGTT  
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600

AATCTGCTATTTGAATAGTCGAGTACGCATTGAAATTTTCCATCCGCGCCAGAACACGAA  
3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660

GACATGGCCTTATCTAAAACAGACCATACGTTATCAATACCAGAAAAATATATTGTTATC  
3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720

GGTATaAAAATAAAAACAACATTGATAAGAGATACATTCTAATTTTCATTTTTGTAAAT  
3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780

TCCTGTACCACGTTGATCTACTTATTCCTAAAGAAATCCATTCTCCATCTCTAACTTTTCG  
3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840

GCCTTCCACCACCAGAGCTTTTTTTTCCACGTTGACGCTGAATTTCAGAAGTATGTGTTT  
3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3900

GTTTAACATACTCTTCAAAGCCAAGCTCTGTAAGGTTCTTACTTGTCCACTTAGCCACAC  
3901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3960

TTTTAGCAATTCCCATGACTTCGTTCTCGTCTAAAGGTGCGGAGAACTGCAGGTTGTAGG  
3961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4020

CTTTAGCGCGTTCAATGCAGGCTTGTAGCCATTGGTCATACTGCGGCCAGCCTTGGCGGA  
4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080

TAGCGCGGTAAGCCCACTTGCGGGTTTTATCGAAGAGGGTGCAGTTACGGCCTAAACCGT  
4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4140

AGTCCGGCAGGATTTTCGCGGTCATTGgCTGCGCCAAGGTCGAGGTAATCGGCTAACCAGT  
4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200

CAAGGGTATAGAGCTCTGGCTGCCAGACGGTGATCTGCCAGTGCAGGTGGTTCCGATTCT  
4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260

TGCAAATTAGCCCTGAATACCCCGCATCTGCGCCCAATTTTTTACGCAGCGCATTCTCGA  
4261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4320

TGGCGGCGGCGTATTTAAGGGGGGCAGCTCGACCATCCGGCGCGGTACGTACCGCCGTAT  
4321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4380

GCAAGGCATACAACAGGTGAGCATGTCCGTTCTCGGGGTTTTTGATGGTGAGTGTGGGCG  
4381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4440

CAGGTGCCCCCAGATCGGCCCAATCAATCGCGGCTCCGGCTCtGTCCACGTCAAAGCAAA  
4441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4500

GCCAGTACATGGCGTGAGGCTGATTAAACTGGATGTATTTTTCGAGGAGAGCACGCTCTT  
4501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4560

TACCGGCAATGCGAACACCAAACCTGTAAATCATCGGAGAAGTACGGCTTGTGGGGTAACC  
4561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4620

GGTCGTTAAAAAGCGTTAAAGCCTGATTATCCAAGGCTCCCAGCCTTATGGCGGGGCTGT  
4621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4680

ERSATZBLATT (REGEL 26)

```
TGTTTTGCACGCTGCATGTGCTAATATCCTTTCTAGGTTTCGACCTAGCCCTGAATGTCA
4681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4740

TGTC CGCTCGCCAAAGTAGAGCATGATTTGCGGGCTTTGTTTTTTCTGCCACTAAGTTAC
4741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4800

ACCTCAACAACGGTTTTTGTTCATCCCCGACAATCCGTTATTCCTGCTTGTTCTCGCACGG
4801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4860

CTTTACGCTCATACTACTTCTTGTAGATACTTGTCACTACATCAAGAGGTGAGATGAT
4861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4920

GGCCACGATTAATATTTCGATCGATGACGAGCTGAAAAGCCGCTCTTATGCCGCACTGGA
4921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4980

AAAGCTGGGCGTAACGCCGTCGAGGTTCTGCGCCAAACACTGGAATATGTGGCCCAAAG
4981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5040

CGGACGTTTGCCGTTCCAGCAGGTTTTGCTGACCGAGGATGATGCCGATTTGATGGCTAT
5041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5100

CGTTCGGGATCGTCTGGAAAACCCACAGGCGGGGCGTAAAGGTGTCACTGGATGAGCTAT
5101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5160

AACCTTGAATTTGATCCCCGAGCCCTGAAGAAGGAATGGCGCAAGCTCGGGGATGATGTC
5161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5220

CGTCTGCAGTTCAAGAAAAAACTCGAGCAGGTTCTACAACACCCCGCGGATCGATAAAAA
5221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5280

TCGCCTGCGAGAGCTGCATGACTGCTACAAAATCAAGCTCCGTGCATCCGGTTATCGCTT
5281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5340

GGTCTATCAGGTTTCGCGATCAAACCATTACGGTATTCGTGGTGGCGGTCGGTAAGGGC
5341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5400

GAGCGTTCTGCCGCTTACGATGCGGCCCCGATAAACGCTTATAAACTCATGCCGTCACCGC
5401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5460

GAGAATACCGCTGTTTCGTGCGCTTGGCTAATTGCTCCAAGCGGCGCAGTGTGTGTTTAA
5461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5520

GCTCTCGACTTCGTGCGCCAAGCCGGTGACTT
5521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5552
```

Abb. 4: Darstellung der Nukleotidsequenz des etwa 5 kb großen Plasmides pMUT2 des Stammes DSM 6601.

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Abbildung 5

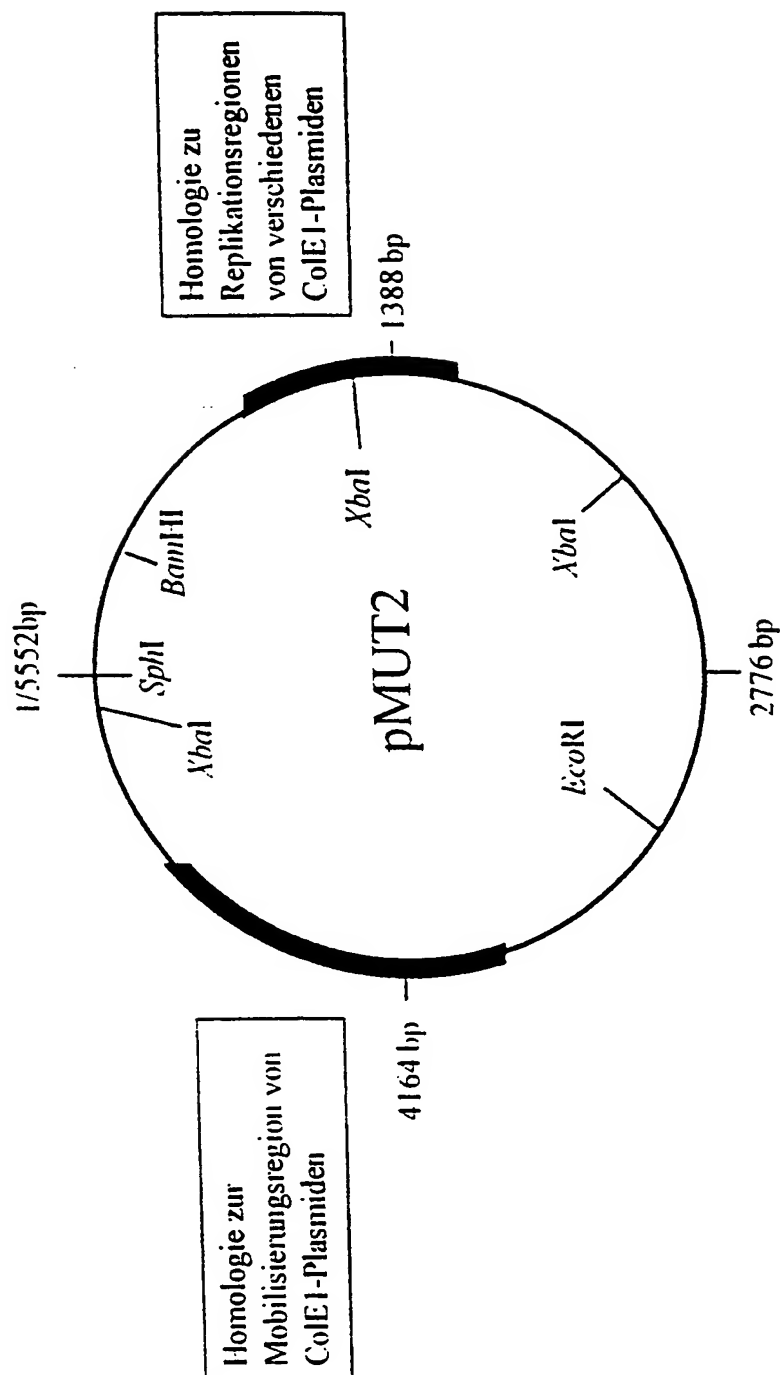


Abb. 5: Restriktionskarte des Plasmides pMUT2. Schwarze Balken symbolisieren die vorgefundenen DNA-Sequenzhomologien zu den DNA-Sequenzen von Plasmiden anderer Enterobakterien. Die Positionen der relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

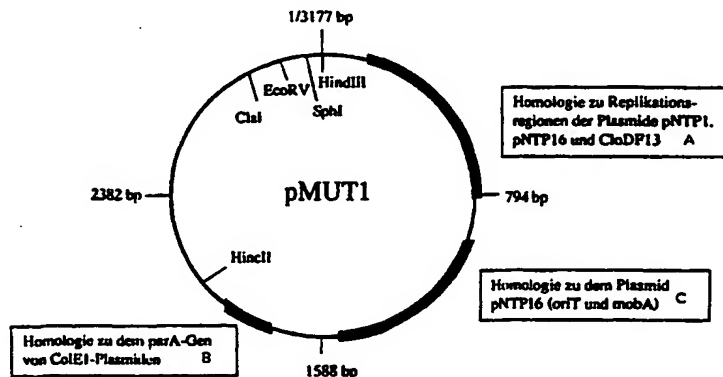


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/70, C12Q 1/68, A61K 31/70</b>		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/44134</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Oktober 1998 (08.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01720		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 1. April 1998 (01.04.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 13 543.9 2. April 1997 (02.04.97) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PHARMA-ZENTRALE GMBH [DE/DE]; Loerfeldstrasse 20, D-58313 Herdecke (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HACKER, Jörg [DE/DE]; Edith-Stein-Strasse 6, D-97218 Gerbrunn (DE). SONNENBORN, Ulrich [DE/DE]; Eichenweg 6, D-44799 Bochum (DE). SCHULZE, Jürgen [DE/DE]; Alice-Bloch-Strasse 7, D-14558 Bergholz-Rehbrücke (DE). BLUM-OEHLER, Gabrielle [DE/DE]; Goethestrasse 3, D-97072 Würzburg (DE). MALINKA, Jürgen [DE/DE]; Paulswiese 11, D-59379 Selm (DE). PROPPERT, Hans [DE/DE]; Rosenstrasse 102, D-58095 Hagen (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(74) Anwalt: HARMSSEN & UTESCHER; Adenauerallee 28, D-20097 Hamburg (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 29. April 1999 (29.04.99)	

(54) Title: BACTERIAL PLASMIDS

(54) Bezeichnung: BAKTERIELLE PLASMIDE



Restriktionskarte des Plasmides pMUT1. Schwarze Balken symbolisieren die vorgefundenen DNA-Sequenzhomologien zu den DNA-Sequenzen von Plasmiden anderer Enterobakterien. Die Positionen der relevanten Restriktionsstellen sind angegeben.

RESTRICTION CARD OF THE pMUT1 PLASMID. BLACK BARS SYMBOLIZE THE DNA SEQUENCE HOMOLOGIES FOUND WITH THE DNA SEQUENCES OF PLASMIDS OF OTHER ENTERIC BACTERIA. THE POSITION OF THE RELEVANT INTERSECTIONS ARE INDICATED.

A... HOMOLOGY WITH THE REPLICATION AREAS OF pNTP1, pNTP16 AND CloDF13 PLASMIDS  
B... HOMOLOGY WITH PAR A GENE FROM ColE1 PLASMIDS  
C... HOMOLOGY WITH THE pNTP16 (oriT AND mobA)

(57) Abstract

The invention relates to plasmids and DNA sequences having the nucleotide sequences illustrated in figure (1) or (4) and to the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Plasmide bzw. DNA-Sequenzen mit den in den Abbildungen (1) oder (4) dargestellten Nucleotidfolgen und deren Verwendung.

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/01720

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/70 C12Q1/68 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CANNON, P. M. ET AL.: "Complete nucleotide sequence and gene organization of plasmid NTP16." PLASMID, vol. 27, no. 3, May 1992, pages 220-30, XP002085747	3,7
Y	see the whole document ---	5,6
X	STIEGLITZ, H. ET AL.: "Identification of a 2-Md plasmid from Shigella flexneri associated with reactive arthritis." ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 32, no. 8, August 1989, pages 937-946, XP002085748	3,7
Y	see the whole document ---	5,6
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 1999

Date of mailing of the international search report

08.03.99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Smalt, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/01720

## 3.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STIRLING, C.J. ET AL.: "The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 cer locus." EMBO JOURNAL, vol. 7, no. 13, 1988, pages 4389-95, XP002085749	3,7
Y	see the whole document -& DATABASE EMBL - EMPRO Entry Pccg1, Acc.No. J01566; M33100, 15 February 1992 "Plasmid ColE1, complete genome." XP002085751 see the whole document	5,6
X	YASUEDA, H. ET AL.: "Structural and functional organization of ColE2 and ColE3 replicons" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 215, 1989, pages 209-16, XP002094006	4,7
Y	see figure 2	5,6
X	BOYD, A.C. ET AL.: "Characterization of the ColE1 mobilization region and its protein products" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 217, 1989, pages 488-98, XP002094007	4,7
Y	see figure 4	5,6
Y	WO 96 34107 A (US GOVERNMENT) 31 October 1996 see page 36, line 5 - line 10 see page 56, line 16 - line 18; claims 10,13,20,21	5,6
A	BLUM, G. ET AL.: "Properties of Escherichia coli strains of serotype O6." INFECTION, vol. 23, no. 4, July 1995, pages 234-6, XP002085750 see the whole document	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 98/01720**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although Claim 6 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that this international application contains several (groups of) inventions, namely:

1. Claims: 1 and 3 fully, 5-7 in part

pMUT1 plasmid with a DNA sequence represented in Seq. ID 1 and their allele variations, use of the plasmid or the DNA sequence in microbiological analysis and/or diagnosis for medical and/or nutritional-physiological or probiotic purposes and/or as expression vector.

2. Claims: 2 and 4 fully, 5-7 in part

pMUT2 plasmid with a DNA sequence represented in Seq. ID 2 and their allele variations, use of the plasmid or the DNA sequence in microbiological analysis and/or diagnosis for medical and/or nutritional-physiological or probiotic purposes and/or as expression vector.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/01720

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9634107 A	31-10-1996	US 5843882 A	01-12-1998
		AU 5669196 A	18-11-1996
		CA 2219105 A	31-10-1996
		EP 0836647 A	22-04-1998
		US 5821081 A	13-10-1998
-----			

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/70 C12Q1/68 A61K31/70

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12Q A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CANNON, P. M. ET AL.: "Complete nucleotide sequence and gene organization of plasmid NTP16." PLASMID, Bd. 27, Nr. 3, Mai 1992, Seiten 220-30, XP002085747	3,7
Y	siehe das ganze Dokument	5,6
X	STIEGLITZ, H. ET AL.: "Identification of a 2-Md plasmid from Shigella flexneri associated with reactive arthritis." ARTHRITIS AND RHEUMATISM, Bd. 32, Nr. 8, August 1989, Seiten 937-946, XP002085748	3,7
Y	siehe das ganze Dokument	5,6
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Februar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

08.03.99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Smalt, R

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STIRLING, C.J. ET AL.: "The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 <i>cer</i> locus." EMBO JOURNAL, Bd. 7, Nr. 13, 1988, Seiten 4389-95, XP002085749	3,7
Y	siehe das ganze Dokument -& DATABASE EMBL - EMPRO Entry Pccgl, Acc.No. J01566; M33100, 15. Februar 1992 "Plasmid ColE1, complete genome." XP002085751 siehe das ganze Dokument ---	5,6
X	YASUEDA, H. ET AL.: "Structural and functional organization of ColE2 and ColE3 replicons" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, Bd. 215, 1989, Seiten 209-16, XP002094006	4,7
Y	siehe Abbildung 2 ---	5,6
X	BOYD, A.C. ET AL.: "Characterization of the ColE1 mobilization region and its protein products" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, Bd. 217, 1989, Seiten 488-98, XP002094007	4,7
Y	siehe Abbildung 4 ---	5,6
Y	WO 96 34107 A (US GOVERNMENT) 31. Oktober 1996 siehe Seite 36, Zeile 5 - Zeile 10 siehe Seite 56, Zeile 16 - Zeile 18; Ansprüche 10,13,20,21 ---	5,6
A	BLUM, G. ET AL.: "Properties of Escherichia coli strains of serotype 06." INFECTION, Bd. 23, Nr. 4, Juli 1995, Seiten 234-6, XP002085750 siehe das ganze Dokument -----	

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Obwohl der Anspruch 6 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
☒ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1 und 3 komplett, 5-7 partiell

Plasmid pMUT1 mit einer in Seq.ID 1 dargestellten DNS-Sequenz und deren Allelvariationen, Verwendung des Plasmids oder der DNS-Sequenz in der mikrobiologischen Analytik und/oder Diagnostik, zu medizinischen und/oder ernährungsphysiologischen bzw. probiotischen Zwecken, und/oder als Expressionsvektor.

2. Ansprüche: 2 und 4 komplett, 5-7 partiell

Plasmid pMUT2 mit einer in Seq.ID 2 dargestellten DNS-Sequenz und deren Allelvariationen, Verwendung des Plasmids oder der DNS-Sequenz in der mikrobiologischen Analytik und/oder Diagnostik, zu medizinischen und/oder ernährungsphysiologischen bzw. probiotischen Zwecken, und/oder als Expressionsvektor.

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01720

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9634107 A	31-10-1996	US 5843882 A	01-12-1998
		AU 5669196 A	18-11-1996
		CA 2219105 A	31-10-1996
		EP 0836647 A	22-04-1998
		US 5821081 A	13-10-1998
<hr/>			